รายงานการฝึกอบรม

เรื่อง
การตรวจหาเชื้อก่อโรคทางอาหารในผลิตภัณฑ์อาหาร
(Determination of food pathogen in food products)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. นวลฉวี เวชประสิทธิ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยรามคำแหง

ณ สถาบัน KIN Food Institute เมือง Neumünster

ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

ระหว่างวันที่ 23 – 29 พฤศจิกายน 2558

รายงานการฝึกอบรม

ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป

1.1 ชื่อ นางสาว นวลฉวี เวชประสิทธิ์ อายุ 55 ปี
ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์
ระดับการศึกษาสูงสุด ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

1.2 ที่ทำงาน สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
โทร. 02-3194385 โทรสาร. 02-3108239

1.3 ฝึกอบรมเรื่อง การตรวจหาเชื้อก่อโรคทางอาหารในผลิตภัณฑ์อาหาร (Determination of food pathogen in food products)
ณ สถาบัน KIN Food Institute เมือง NeumÜnster ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
ตั้งแต่วันที่ 23-29 พฤศจิกายน 2558 รวมระยะเวลา 7 วัน
แหล่งให้ทุน มหาวิทยาลัยรามคำแหง

ส่วนที่ 2 สรุปย่อของการฝึกอบรม

การฝึกอบรมเกี่ยวกับขอบข่ายงานทั้งหมดของหน่วยงาน KIN Food Institute : เมือง Neumunster ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี ชนิดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร ปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารพิษ เช่น ออกซิเจน น้ำที่จำเป็นในอาหาร (water activity) อุณหภูมิ สารอาหาร ฯลฯ ชนิดของอาหารที่เป็นสื่อของโรค อาการและความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ การป้องกัน วิธีการตรวจสอบหาเชื้อก่อโรคระบบทางเดินอาหารหลายๆวิธีเช่น แบบเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบบตรวจสอบระดับโมเลกุล (Molecular detection system (MDS) และดีเอ็นเอ (Polymerase chain reaction, PCR) ฝึกปฏิบัติการตรวจสอบเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* ในห้องปฏิบัติการ เช่น การเตรียมตัวอย่างอาหาร การเจือจางตัวอย่าง การลงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ การบ่มเพาะเชื้อ การอ่านและแปลผล การใช้เครื่องตรวจสอบ MDS & PCR การเตรียมตัวอย่างเฉพาะวิธีดังกล่าว การอ่านและแปลผล การรายงานผล การทดสอบความเพียงพอในการฆ่าเชื้อและการศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารโดยวิธี challenge test

ส่วนที่ 3 รายละเอียดเกี่ยวกับการฝึกอบรม

3.1 วัตถุประสงค์

1. เพื่อทราบกระบวนการทำงานของหน่วยงานที่มีชื่อเสียงระดับนานาชาติและมีความพร้อมในด้านต่างๆ เช่น การฝึกอบรมและการสัมมนาด้านต่างๆ เช่น ประกันคุณภาพอาหาร การตรวจประเมินด้านสุขลักษณะ การถนอมอาหาร ภาชนะบรรจุ การตรวจสอบจุลินทรีย์ในอาหาร การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส ฯลฯ การรับวิเคราะห์และออกใบรับรองคุณภาพผลิตภัณฑ์อาหาร (คุณภาพทางจุลินทรีย์ เคมี ความสมบูรณ์ของภาชนะบรรจุ ฯลฯ) การวิจัยร่วมกับหน่วยงานเอกชนในโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น
2. เพื่อฝึกอบรมเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดที่สำคัญในอาหารและวิธีการตรวจสอบแบบต่างๆ เช่น Molecular detection system, Polymerase chain reaction, Conventional method etc.
3. เพื่อเพิ่มโอกาสและสร้างความสัมพันธ์ในการแลกเปลี่ยนความรู้และประสบการณ์ในการทำงานและการวิจัยกับผู้เชี่ยวชาญจากสถาบันที่มีชื่อเสียงซึ่งจะเป็นประโยชน์ทางด้านการเรียนและการทำวิจัยร่วมกัน

3.2 ตารางการฝึกอบรม

Schedule "Determination of Food Pathogens in Food Products"

Day 1: Theoretical background concerning food-borne pathogens, working in lab (Biosafety level 2)

Day 2: Sample preparation, initial suspension for microbiological analysis (comparison of different enrichment media)

Day 3: Determination of *Salmonella* spp. By using three different methods:

Method 1: cultural detection method according to LFGB

Method 2: PCR (polymerase chain reaction)

Method 3: MDS (molecular detection system)

Day 4: Determination of *Listeria* spp./*Listeria monocytogenes* by using three different methods:

Method 1: cultural detection method according to LFGB

Method 2: PCR (polymerase chain reaction)

Method 3: MDS (molecular detection system)

Day 5: Determination/Enumeration of *Bacillus cereus* (Myp-agar/blood agar)

Day 6: Determination/Enumeration of *Clostridim perfringens* (tsc-agar, reverse CAMP-test)

Day 7: Determination/Enumeration of *Staphylococcus aureus* (Baird-parker-agar, coagulase test)

3.3 เนื้อหาในการฝึกอบรม

สถาบัน KIN Food Institute ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน ก่อตั้งเมื่อปีคศ. 1965 เป็นองค์กรอิสระที่มีสมาชิกมาจากหน่วยงานเอกชนจำนวน 260 แห่ง (โรงงานผลิตอาหาร วัตถุเจือปนอาหารและเครื่องเทศ เครื่องจักร สถาบัน และองค์กรด้านอาหาร สารทำความสะอาดและสุขลักษณะ ภาชนะบรรจุ อาหารสัตว์ ยา เครื่องสำอางค์ และอื่นๆ) มีบุคคลากรจำนวน 70 คน หารายได้จากการรับฝึกอบรม สัมมนา (เทคโนโลยีอาหาร การประกันคุณภาพ สุขลักษณะ HACCP การประเมินด้านประสาทสัมผัส การจัดการองค์กร) วิจัย (การพัฒนาผลิตภัณฑ์ การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคในท้องตลาด การทดสอบทางประสาทสัมผัส ศึกษาอายุการเก็บรักษาอาหาร ศึกษาความเพียงพอในการฆ่าเชื้อระดับสเตอริไลซ์ เช่น การส่งผ่านความร้อนเข้าสู่อาหาร และการกระจายความร้อนในเครื่องฆ่าเชื้อ เพื่อคำนวณหาอุณหภูมิ เวลาการฆ่าเชื้อที่เหมาะสมและปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้อง วิจัยด้านการตลาด การใช้ภาชนะบรรจุอาหารที่เหมาะสม) ตรวจวิเคราะห์คุณภาพภาชนะบรรจุ(ความสมบูรณ์ของตะเข็บ การละลายของพลาสติกในอาหาร) คุณภาพผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น อาหารกระป๋อง เครื่องดื่ม ผัก&ผลไม้สดและแปรรูป เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ นมและผลิตภัณฑ์ น้ำมันพืช น้ำดื่ม น้ำแร่ เครื่องเทศ วัตถุเจือปนอาหาร อาหารสัตว์ อาหารเสริม ด้านจุลินทรีย์ (เช่น Colony Count, Hygiene Audit, Spoilage germs (yeasts & Molds), Pathogenic germs (*Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Enterococci* spp.) Sterility Test) ด้านเคมี (วัตถุเจือปนอาหาร สารปนเปื้อน วิตามิน แร่ธาตุ สารก่อภูมิแพ้ ฮีสตามีน โปรตีน ไขมัน เส้นใยอาหาร ฯลฯ) ด้านประสาทสัมผัส ฯลฯ ด้านการพัฒนานวัตกรรมและเทคโนโลยี รับเป็นที่ปรึกษา (ด้านคุณภาพผลิตภัณฑ์ กฎหมายอาหาร กระบวนการผลิต เชื้อจุลินทรีย์ การจัดการด้านสุขลักษณะ ภาชนะบรรจุ) มีเครื่องมือที่ทันสมัยและได้มาตรฐานสากล เช่น HPLC, GC, เครื่องวัดความสมบูรณ์ของตะเข็บกระป๋อง มีผู้เชี่ยวชาญที่มีความสามารถในด้านต่างๆ มีความเป็นกลางและได้รับความเชื่อถือจากหน่วยงานตรวจสอบของรัฐบาลให้ออกใบรับรองคุณภาพสินค้าที่จำหน่ายภายในประเทศสินค้านำเข้าและส่งออก นอกจากนี้ยังเป็นสถาบันที่มีโรงเรียนสอนด้านวิชาชีพเฉพาะทางด้านอาหารหลักสูตร 2 ปี (เทคโนโลยีการผลิต เทคโนโลยีการแปรรูปเนื้อสัตว์ การจัดการโรงงานและกระบวนการผลิต catering) โดยได้รับใบประกาศนียบัตร และระดับปริญญาตรีด้านเทคโนโลยีอาหารและการจัดการผลิตภัณฑ์

หลักสูตร 3 ปี (ปริญญา B.A. in Business Administration) และรับเป็นที่ปรึกษาวิจัยให้กับนักศึกษาทั้งปริญญาโทและเอกร่วมกับอาจารย์จากมหาวิทยาลัยต่างๆ เช่น ที่เมือง Kiel, Hamburg

มีการแบ่งส่วนของหน่วยงานความรับผิดชอบ ดังนี้

1. งานบริหารส่วนบุคคล ฝ่ายการเงิน
2. งานฝึกอบรม ติดต่อประสานงานกับองค์กรต่างๆ
3. งานการประกันคุณภาพ : วิเคราะห์ทางเคมี จุลินทรีย์ วิเคราะห์และวิจัยด้านภาชนะบรรจุ กฎหมายอาหาร
4. งานด้านการทดสอบทางประสาทสัมผัสและการวิจัยทางการตลาด
5. การพัฒนาด้านนวัตกรรมและเทคโนโลยี การพัฒนาผลิตภัณฑ์
6. โรงเรียนสอนด้านวิชาชีพเฉพาะทางด้านอาหาร (Technical school) (ประกาศนียบัตร)
7. โรงเรียนสอนด้านเทคโนโลยีอาหารและการจัดการผลิตภัณฑ์ (ปริญญาตรี)

ทฤษฎีเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญ

1. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเป็นแท่ง (rod) เจริญได้ดีทั้งในสภาพมีและไม่มีอากาศ ส่วนใหญ่การปนเปื้อนมักเกิดจากสปอร์ปนเปื้อนไปในห่วงโซ่อาหารที่ได้รับการปรุงที่ไม่เหมาะสม เมื่อสปอร์เจริญเป็น vegetative cell จะสร้างสารพิษ (enterotoxin) และทำให้เกิดโรคเมื่อบริโภคเข้าไป ปริมาณที่ก่อโรคได้คือมากกว่า 106 เซลต่อกรัมอาหาร สิ่งแวดล้อมอื่นที่พบเชื้อได้แก่ ดิน อากาศ ฝุ่น น้ำ

Enterotoxin เป็นสารพิษประเภทโปรตีน ที่ถูกสร้างโดยจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กตอนล่างมักเป็นพิษต่อเซลเยื่อบุผนังลำไส้ ส่วนใหญ่เป็นสารพิษที่ขับออกมาโดยแบคทีเรียที่ไปทำให้เกิดรูพรุนในเซลเมมเบรน มีผลทำให้เซลล์ตาย หลังจากเซลล์บุผนังลำไส้เล็กตาย ของเหลวต่างๆ จึงไหลออกมา ทำให้เกิดอาการท้องร่วง ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สร้าง enterotoxin ได้แก่ *E. coli* 0157:H7, *Clostridium perfringens, Vibrio cholerae, Staphylococcus aureus*, Rotavirus และ *Yersinia enterocolitica* อย่างไรก็ตาม สารพิษที่สร้างโดย *B. cereus* มีสองชนิดคือ ชนิดที่ทำให้ท้องร่วง (diarrhea toxin) ซึ่งเป็น enterotoxin และ ชนิดที่ทำให้อาเจียน (emetic toxin)

อาการ

อาการของพิษที่ทำให้ท้องร่วง คือ คลื่นไส้ ปวดท้อง และท้องร่วงเป็นน้ำ โดยเริ่มมีอาการระหว่าง 8 ถึง 16 ชั่วโมงหลังจากบริโภค และเกี่ยวข้องกับลำไส้เล็กส่วนล่าง ส่วนอาการของพิษที่ทำให้อาเจียนนั้น อาการร้ายแรงกว่าและเฉียบพลัน โดยมีอาการคลื่นไส้ และอาเจียน เริ่มภายใน 1 ถึง 6 ชั่วโมงหลังบริโภค และเกี่ยวข้องกับลำไส้เล็กส่วนบนเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตาม โรคที่เกิดจากเชื้อชนิดนี้ไม่ติดต่อ

อาหารที่เกี่ยวข้อง

• อาหารดิบ อาหารแห้ง หรืออาหารสำเร็จรูปเช่น ธัญพืช เครื่องเทศและอาหารแห้งชนิดอื่น

• อาหารประเภทเนื้อและสัตว์ปีก เช่นไก่งวง เนื้อวัว รวมทั้งอาหารทะเล สลัดมันฝรั่ง ข้าว ก๋วยเตี๋ยว อาหารผสม (ซอส ซุป) นมผง ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ขนมหวาน โดยเฉพาะที่มีคัสตาร์ดและครีมอยู่ ชนิดที่สร้างพิษทำให้อาเจียน มักจะเจริญได้ดีบนข้าวสุก มันฝรั่งบด หรืออาหารจำพวกแป้งอื่น ๆ และหน่อไม้ที่เก็บในความเย็นไม่เหมาะสม ในขณะที่ชนิดที่สร้างพิษทำให้ท้องร่วง ชอบเจริญบนอาหารหลายประเภท เช่น ผัก และสลัด และ อาหารที่ปั้นเป็นก้อนกลม

การป้องกัน

• ใช้อุณหภูมิสูงพอในการปรุงอาหารผสมเช่นซอส คัสตาร์ด และซุปเพื่อทำลายเชื้อ

• เก็บอาหารที่สุกแล้วที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส (ขณะรอเสิร์ฟ)

• อาหารสุกแล้วต้องการเก็บ ต้องให้เย็นตัวอย่างเร็วโดยการแยกแบ่งใส่ภาชนะ โดยใส่ในภาชนะที่ลึก

ไม่เกิน 10 เซนติเมตร แล้วเก็บในที่เย็นทันที

• อุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาอาหารสุกแล้ว ควรต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียสเพื่อป้องกันการสร้างสารพิษ

• เลี่ยงการเก็บอาหารประเภทโปรตีนร่วมกับพวกแป้งเช่นข้าว เพราะจะไปกระตุ้นการเจริญของเชื้อชนิดนี้อุ่นอาหารอีกครั้งที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส เพื่อทำลายสารพิษ

• ป้องกันการปนเปื้อนข้าม จากอาหารดิบไปสู่อาหารสุก โดยใช้บริเวณเตรียมอาหารแยกกัน หรือทำความสะอาดฆ่าเชื้อระหว่างการทำงาน

• ล้างผักผลไม้ด้วยน้ำสะอาด มาตรฐานน้ำดื่ม ก่อนใช้

• ให้แน่ใจว่าผู้ที่สัมผัสอาหาร มีสุขอนามัยส่วนบุคคลที่ดี และมีการฝึกอบรมการอภิบาลอาหารมาอย่างเพียงพอ (food safety training)

2. *Campylobacter* spp.

แคมไพโลแบคเตอร์ (*Campylobacter* spp.) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปเกลียว เคลื่อนที่ได้เพราะมี flagella ชนิดที่พบว่าก่อโรคมากที่สุดในคนคือ *C. jejuni* และ *C. coli* ส่วน *C. fetus* พบว่าเป็นสาเหตุการแท้งลูกในสัตว์ เช่น วัวควายและแกะ และในคนแล้วแต่โอกาส แคมไพโลแบคเตอร์เป็นแบคทีเรียที่ไม่ทนต่อความร้อน ความแห้ง และการขาดออกซิเจน เจริญได้ดีในอุณหภูมิร่างกายของสัตว์ปีก โดยสัตว์ปีกที่มีเชื้อนี้จะไม่แสดงอาการใดๆ จึงเป็นแหล่งแพร่เชื้อที่สำคัญ การแช่เยือกแข็งสามารถลดจำนวนเชื้อชนิดนี้ในเนื้อสดได้เช่นกันถือว่าแคมไพโลแบคเตอร์เป็นโรคติดต่อได้หลายทาง เช่น จากมูลสัตว์สู่คน (เช่นมือเปื้อน)จากคนสู่คน ติดต่อทางเพศสัมพันธ์ และจากอาหารหรือน้ำที่ปนเปื้อน

อาการของโรค

ท้องร่วง (อาจมีเลือดปน) ปวดเกร็งบริเวณท้อง และมีไข้ โดยอาจมีอาการคลื่นไส้และอาเจียนปนด้วย อาการจะแสดงภายใน 2-5 วันหลังจากได้รับเชื้อ

อาหารที่เกี่ยวข้อง

การเกิดโรคนี้ส่วนใหญ่เนื่องจากการบริโภคเนื้อสัตว์ปีกดิบๆ สุกๆ หรือดื่มนมที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ และดื่มน้ำที่ปนเปื้อน และอาจพบในอาหารอื่นได้หากมีการปนเปื้อนข้ามกัน (cross contamination) การปนเปื้อนมักมาจากมูลของนกป่วยที่ไม่แสดงอาการ และแพร่เชื้อลงไปในแหล่ง น้ำ ดิน หรือพืช ซึ่งต่อมาสัตว์อื่นอาจมาสัมผัสมูลของสัตว์ติดเชื้อแล้วแพร่เชื้อต่อ หรือดื่มน้ำปนเปื้อนเชื้อเข้าไปแล้วแพร่เชื้อต่อ นอกจากนี้ เชื้ออาจถ่ายเทจากลำไส้ไปยังเนื้อขณะแล่ก็ได้ เช่นขณะแล่ไก่ ส่วนนมที่ปนเปื้อนนั้น มาจากแม่วัวที่ติดเชื้อที่เต้านมแล้วไปปนเปื้อนน้ำนม หรือน้ำปนเปื้อนกับปุ๋ยคอกสดหรือมูลสัตว์ แล้วไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ

กลุ่มคนเป้าหมาย

ทุกคนมีโอกาสติดเชื้อนี้ได้หากบริโภคอาหาร หรือดื่มน้ำหรือนม ที่ปนเปื้อนเข้าไป อย่างไรก็ตาม สัตว์ก็มีโอกาสติดเชื้อนี้ด้วย แล้วติดต่อมาสู่คนได้ผ่านการสัมผัสสัตว์หรือมูลสัตว์ที่ติดเชื้ออยู่

การป้องกัน

โดยทั่วไปมีข้อปฏิบัติในการจัดการอาหารอย่างง่ายๆ เพื่อป้องกันการติดเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์อยู่แล้ว ทั้งในระดับฟาร์มและในโรงงาน โดยอาศัยหลักการปฏิบัติที่ดีด้านสุขอนามัยนอกจากนี้หลักการที่พึงปฏิบัติโดยทั่วไปคือ ปรุงผลิตภัณฑ์สัตว์ปีกทุกชนิดให้สุก ล้างมือด้วยสบู่ทุกครั้งก่อนและหลังการสัมผัสอาหารดิบที่มาจากเนื้อสัตว์ ป้องกันการปนเปื้อนข้ามในห้องครัวโดยใช้เขียงแยกสำหรับอาหารที่มาจากเนื้อสัตว์ เลี่ยงการดื่มนมดิบและน้ำดิบ ล้างมือหลังจากเข้าห้องสุขา และล้างมือหลังจากสัมผัสสัตว์เลี้ยง เหล่านี้เป็นต้น

3. *Clostridium perfringens*

C. perfringens เป็นแบคทีเรีย แกรมบวก รูปแท่ง เจริญไม่ได้ในที่มีออกซิเจน (anaerobe) ไม่เคลื่อนที่ และสร้างสปอร์ได้ ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารทั้งในคนและสัตว์ ขณะนี้ที่พบและได้ทำการศึกษาแล้วมี

5 ชนิด ได้แก่ *C. perfringens* ไทป์ เอ บี ซี ดี และ อี โดยที่ไทป์เอเท่านั้น ที่ตรวจพบในดินและระบบทางเดินอาหารของคน ชนิดที่เหลือเป็นปรสิตถาวร (obligate parasite) จะพบในสัตว์ที่มีชีวิตเท่านั้น ไม่พบในดิน

การก่อโรคของแต่ละชนิด

- ไทป์ เอ ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในคน
- ไทป์ บีและดี ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารในสัตว์
- ไทป์ ซี ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารในสัตว์ และลำไส้อักเสบในคน

ทั้งนี้ ชนิดที่สำคัญในการก่อโรคในคนที่จะกล่าวในรายละเอียดในที่นี้คือ ไทป์ เอ ซึ่งมีสปอร์ทนความร้อนสูงถึง 80 องศาเซลเซียส ได้นานกว่า 1 ชั่วโมง ดังนั้น อุณหภูมิ และเวลาในการปรุงอาหารจึงมีความสำคัญต่อการทำลายหรือส่งผลให้สปอร์ที่หลงเหลืออยู่เจริญเติบโตต่อไปได้

อาการ

อาการจะเกิดขึ้นเมื่อรับ *C. perfringens* มากกว่า 108 เซลต่อกรัมอาหาร โดยอาการเริ่มแรกคือ ปวดเกร็งที่ท้อง ท้องร่วงอย่างแรง มักไม่พบอาการคลื่นไส้หรืออาเจียน ระยะฟักตัวคือ 8-22 ชั่วโมง และหายได้ภายใน 24ชั่วโมง แต่คนไข้สูงอายุหรือเด็กเล็กอาจเสียชีวิตได้

อาหารที่เกี่ยวข้อง

อาหารที่พบว่าเกี่ยวข้องกับการระบาด ได้แก่ อาหารประเภทเนื้อสัตว์ เช่นเนื้อวัว เนื้อไก่ เนื้อหมู และน้ำเกรวี่ (gravy) ที่มีเซลล์หรือสปอร์ของแบคทีเรียชนิดนี้ปนเปื้อน ซึ่งอาจเนื่องมาจากสุขลักษณะและกระบวนการผลิตในเรื่องของอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม และสุขอนามัยส่วนบุคคลของผู้ปฏิบัติงานหรือสัมผัสอาหารไม่เหมาะสม

กลุ่มคนเป้าหมาย

กลุ่มคนที่มีโอกาสได้รับแบคทีเรียชนิดนี้เข้าไปคือ กลุ่มคนที่รับประทานอาหารร่วมกันเป็นกลุ่มใหญ่ เช่น ตามโรงอาหารของโรงเรียน โรงพยาบาล และอื่นๆ ที่มีการเตรียมอาหารปริมาณมากและบางชนิดระหว่างรอเสิร์ฟเก็บไว้ที่อุณหภูมิไม่เหมาะสมหรือมีการปนเปื้อนข้าม ทำให้เชื้อหรือสปอร์ที่ปนเปื้อนอยู่มีโอกาสเจริญเติบโต และก่อนเสิร์ฟ มีการอุ่นหรือให้ความร้อนไม่เพียงพอ

การควบคุม

การควบคุมโรค อาจทำได้โดย ควบคุมสุขลักษณะการผลิตและสุขอนามัยส่วนบุคคลของผู้ปฏิบัติงานหรือสัมผัสอาหาร ใช้อุณหภูมิในการปรุงอาหารสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส และมีการอุ่นอาหารอย่างเพียงพอก่อนรับประทาน โดยเฉพาะในกรณีที่ปรุงอาหารปริมาณมาก และมีการทิ้งให้เย็นก่อนการรับประทาน นอกจากนี้ ถ้าในอาหารมีเกลืออยู่มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 5 หรือมีโซเดียมไนเตรทอยู่ร้อยละ 2.5 จะหยุดหรือชะลอการเจริญของ *C. perfringens* ได้

4. *Salmonella* spp.

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative bacteria) พบได้ทั่วไปในดิน ในน้ำ (แต่ในทะเลเปิดจะไม่พบ) ในสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์ปีกและสุกร ไปจนถึงมูลสัตว์ต่างๆ และแหล่งน้ำหรือสิ่งแวดล้อมที่อยู่ใกล้ชายฝั่งที่มีโอกาสปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลสูง อุณหภูมิที่เจริญได้ดีคือ 37-45 องศาเซลเซียส

โรคที่เกิดจาก *Salmonella* spp. มี 3 กลุ่ม ได้แก่

4.1 ไข้ทัยฟอยด์ หรือไข้รากสาดใหญ่ (typhoid fever หรือ enteric fever) มีความรุนแรงที่สุด สาเหตุคือ *Salmonella typhi* แหล่งของชนิดนี้มาจากคนเท่านั้น โดยการติดต่อเกิดจากการปนเปื้อนอุจจาระของผู้ป่วยลงสู่แหล่งน้ำและอาหาร **อาการ** มีไข้สูง ปวดศีรษะ ท้องร่วง อาเจียน มีการติดเชื้อในกระแสเลือด และพบจุดสีแดงบริเวณหน้าอกและลำคอ

4.2 ไข้พาราทัยฟอยด์หรือไข้รากสาดเทียม เกิดจาก *S. paratyphi* ไทป์ เอ บี และซี **อาการ** คล้ายกับไข้ทัยฟอยด์ แต่รุนแรงน้อยกว่า

4.3 กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) สาเหตุคือ *Salmonellae* หลายซีโรไทป์นอกเหนือจากสองชนิดแรก **อาการ**คือท้องร่วง ปวดท้องน้อย ตัวเย็น มีไข้ อาเจียน ปวดศีรษะ พบอัตราการตายสูงในผู้ป่วยเด็กและคนชรา ร้อยละ 0.1-0.2 ในขณะที่ อัตราการตายจากไข้ทัยฟอยด์สูงถึงร้อยละ 10 โดยทั่วไปแสดงอาการภายใน 6-48 ชั่วโมง โดยปริมาณที่รับเข้าไปอาจเล็กน้อยเพียง 15-20 เซลล์ ขึ้นกับอายุและสุขภาพของผู้รับและชนิดของเชื้อ สาเหตุของโรคเกิดจากสารพิษประเภทเอนโดท็อกซิน (endotoxin) ถูกสร้างขึ้นที่บริเวณผนังเซล โดยสารพิษนี้จะไปกระตุ้นทำให้อักเสบบริเวณผนังลำไส้เล็ก

อาหารที่เกี่ยวข้อง

เนื้อดิบ สัตว์ปีก ไข่ นม และผลิตภัณฑ์นม ปลา กุ้ง ขากบ ไอศกรีม บีฟเจอร์กี (beef jerky) ยีสต์ มะพร้าว น้ำสลัด เค้กมิกซ์ ของหวานสอดไส้หรือราดครีม เจลาตินแห้ง เนยถั่ว โกโก้ และช็อคโกแลต และขณะนี้พบ *Salmonella enteritidis* ในไข่แดง

การควบคุม/ป้องกัน

สามารถควบคุมได้โดยการมีสุขอนามัยที่ดี ของทั้งการผลิตและส่วนบุคคล ในส่วนของการผลิต ต้องมีการทำความสะอาด ฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวโรงงานและอุปกรณ์ทุกอย่างที่สัมผัสอาหารเป็นอย่างดี ทั้งนี้ พบว่า แอลกอฮอล์เป็นสารฆ่าเชื้อที่ได้ผลดีสำหรับซัลโมเนลลา หรืออาจใช้ quaternary ammonium ผสมกับ แอลกอฮอล์เป็นสารฆ่าเชื้อที่สัมผัสกับอาหารได้ โดยมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ยาวนาน นอกจากนี้ มีการใช้ sodium hypochlorite (bleach) ในการทำความสะอาดพื้นผิวเพื่อป้องกันซัลโมเนลลาเช่นกัน

5. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียที่พบโดยทั่วไปในอากาศ ฝุ่นละออง น้ำโสโครก นม และอาหาร หรือบนอุปกรณ์ผลิตอาหาร พื้นผิวของสิ่งแวดล้อม มนุษย์และสัตว์ (ในจมูก ลำคอ ผม และผิวหนัง เป็นต้น) มนุษย์และสัตว์เป็นแหล่งปฐมภูมิของ *S. aureus*

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม จับกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น บางครั้งอาจอยู่เป็นคู่หรือจับกันเป็นสายสั้น ๆ เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ แต่ก็สามารถเจริญได้ในสภาวะไม่มีอากาศเช่นกัน อุณหภูมิที่เจริญและสร้างสารพิษกว้างมากตั้งแต่ 4 – 46 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างต่ำสุดที่อยู่ได้คือ 4.8 (สภาวะมีอากาศ) และ 5.5 (สภาวะไร้อากาศ) ความเป็นกรด-ด่างสูงสุดที่เจริญได้คือ 6.0 ปกติ *S. aureus* จะเจริญบนอาหารสู้แบคทีเรียชนิดอื่นไม่ได้ และอาหารอาจเน่าเสียเสียก่อนที่มันจะเจริญและสร้างสารพิษได้ แต่หากมีการปนเปื้อนบนอาหารที่ปรุงแล้ว มันจะมีโอกาสเจริญและสร้างสารพิษได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในอาหารที่มี a_w ต่ำ เช่น 0.86 และเกลือสูงถึงร้อยละ 18 ซึ่ง *S. aureus* เจริญได้ แต่แบคทีเรียชนิดอื่นทนไม่ได้ นอกจากนี้สารพิษของ *S. aureus* ซึ่งเป็นเอนเทอโรทอกซินชนิดหนึ่ง เป็นสารที่ทนความร้อนจากการหุงต้มหรือจากกระบวนการให้ความร้อนในอาหารกระป๋องจำนวนเชื้อที่มีผลต่อการสร้างสารพิษ คือ มากกว่า 106 เซลต่อกรัมอาหาร และสารพิษปริมาณที่น้อยกว่า 1.0 ไมโครกรัมก็สามารถก่อโรคได้

อาการ

อาการอาจเกิดขึ้นในช่วงเวลา 1-7 ชั่วโมง อาการทั่วไปคือ มีน้ำลายมาก วิงเวียนศีรษะ อาเจียน ปวดท้อง และท้องร่วง อาจมีมูกเลือดปนมาด้วย ในกรณีอาการรุนแรง มักมีอาการปวดศีรษะ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ เหงื่อออก ตัวสั่น และร่างกายมีอุณหภูมิต่ำกว่าปกติ อาการนี้จะหายไปได้เองภายหลังขับถ่ายเอาอาหารที่มีเชื้อออกได้หมดแล้ว หากเป็นเด็ก อาจมีอาการรุนแรงและถึงตายได้ อย่างไรก็ตาม การเกิดการระบาดที่แท้จริงอาจยากที่จะบอกสาเหตุได้ เพราะอาจมีการสับสนกับอาการของอาหารเป็นพิษเนื่องจาก *Bacillus cereus* (อาการอาเจียนเหมือนกัน) และการเก็บตัวอย่างเพื่อการตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการอาจไม่เพียงพอต่อการยืนยัน

อาหารที่เกี่ยวข้อง

อาหารที่มักพบเป็นสาเหตุอาหารเป็นพิษเนื่องจากสารพิษของ *Staphylococcus* ได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์สัตว์ปีกและไข่ สลัดเช่น ไข่ ทูนา ไก่ มันฝรั่ง และมักกะโรนี ผลิตภัณฑ์ขนมอบ เช่นขนมอบที่มีไส้ครีม พายไส้ครีม และเอแคลร์ไส้ชอกโกแลต ไส้แซนด์วิช และนมและผลิตภัณฑ์นม ส่วนใหญ่จะเป็นอาหารที่มีการจัดการหลายขั้นตอน มีอุณหภูมิการเก็บรักษาไม่เหมาะสม เช่นไม่เย็นพอ (สูงกว่า 7.2 องศาเซลเซียส) หรืออุ่นให้ร้อนก่อนรับประทานไม่เพียงพอ (ต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส) สาเหตุจึงมักเกิดจากการปนเปื้อนหลังการผลิตหรือปรุง หรือระหว่างการเตรียมอาหาร

กลุ่มคนเป้าหมาย

เชื่อว่าทุกคนติดเชื้อประเภทนี้ได้ อย่างไรก็ตาม ความรุนแรงของอาการอาจแตกต่างกันไปแล้วแต่บุคคล และปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง

การควบคุม/ป้องกัน

ถึงแม้ว่าอัตราการตายเนื่องจากพิษของ *Staphylococcus* จะน้อย และมักเกิดกับผู้สูงวัยเด็กทารกและผู้ที่อ่อนแอ ก็ควรมีการป้องกันหรือควบคุมโดยการรักษาสุขอนามัยส่วนบุคคลและสุขลักษณะของพื้นผิวสิ่งแวดล้อมที่ใช้ในการเตรียม ปรุงหรือ ผลิตอาหารนั้น ๆ รวมทั้งการควบคุมอุณหภูมิในการเก็บรักษาที่เหมาะสม และอุ่นอาหารก่อนรับประทานหลังจากปรุงเก็บไว้นานด้วยอุณภูมิที่สูงเพียงพอ ก็อาจควบคุมอาหารเป็นพิษเนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้ได้

6. *Listeria monocytogenes*

เป็นแบคทีเรียในสกุล *Listeria* มีรูปร่างลักษณะเป็นท่อนสั้น มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ไมโครเมตร ยาว 0.5-2 ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นสายต่อกัน 3-5 เซลล์ หรือมากกว่านั้น เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) ไม่สร้างสปอร์ (non spore forming bacteria) สร้างแคปซูล อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตคือ 37 องศาเซลเซียส แต่สามารถเติบโตได้ทุกอุณหภูมิ แม้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 2.5 องศาเซลเซียสและสามารถทนความร้อนได้ดีกว่าแบคทีเรียทีไม่สร้างสปอร์ ถูกทำลายได้โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการปรุงอาหารหรือความร้อนในระดับพาสเจอไรซ์ ดังนั้นการปนเปื้อนเชื้อชนิดนี้ในอาหารจึงเกิดขึ้นหลังขั้นตอนการปรุงหรือเกิดการปนเปื้อนซ้ำในระหว่างขั้นตอนการบรรจุ การขนส่ง และการวางจำหน่าย สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เป็นจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) บทบาทสำคัญต่อความปลอดภัยทางอาหาร (food safety)

ลักษณะพิเศษ

Listeria สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไปได้อย่างกว้างขวาง เนื่องจาก *Listeria* สามารถทนทานต่อสภาวะต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมได้ดีโดยพบเชื้อได้ในวัตถุดิบทีจะนำ ไปประกอบอาหารโดยเฉพาะเนื้อสัตว์หรือผลิตผลจากสัตว์ เช่น น้ำนม อาหารที่เป็นกรด (acid food) อาหารที่มี water activity ต่ำ และในสภาวะอุณหภูมิที่ค่อนข้างกว้างตั้งแต่ระดับอุณหภูมิในร่างกายจนกระทั่งอุณหภูมิในตู้เย็น (psychrotrophic)

การเกิดโรค

Listeria monocytogenes สามารถถ่ายทอดเข้าสู่ร่างกายได้ โดยการรับประทานอาหารทีมีเชื้อปนเปื้อน อาหารที่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อได้แก่ นม เนื้อ ไก่ อาหารทะเล ส่วนในผักไม่พบหรือพบน้อยมาก ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ติดต่อผ่านทางอาหาร ทำให้เกิดโรคลิสเทอริโอสิส (Listeriosis) มีอาการคล้ายเป็นหวัด เช่น มีไข้ปวดหัว มีอาการท้องเสีย อาเจียน อาการติดเชื้อ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) การติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) และการแท้ง (abortion) พบว่าอัตราป่วยจนทำให้เสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 20-30 พบวิธีระบาดของเชื้อนี้เกิดขึ้นได้หลายทาง เช่น จากแม่สู่ลูก จากสัตว์สู่คน และจากโรงพยาบาล มักพบในผู้ป่วยที่มี

ระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอ หรือทารกที่เกิดจากมารดาที่ได้รับเชื้อขณะตั้งครรภ์และยังมีรายงานว่ามีผู้เสียชีวิตเนื่องจากบริโภคอาหารทีมีเชื้อปนเปื้อน

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *Listeria monocytogenes* [a]

ปัจจัย	สามารถเจริญ [b]			สามารถรอดได้แต่ไม่เจริญ
	Lower growth limit	optimum	Upper growth limit	
อุณหภูมิ	-1.5 ถึง +3.0	30.0 ถึง 37.0	45.0	-18.0
pH	4.2 ถึง 4.3	7.0	9.4 ถึง 9.5	3.3 ถึง 4.2
Salt concentration (%) [e]	< 0.5	0.7	12 - 16	≥ 20
วอเตอร์แอคทิวิตี้ (water activity,a_w)	0.90 ถึง 0.93	0.99	> 0.99	< 0.90
บรรยากาศ (atmosphere)	เป็นประเภท Facultative anaerobe คือสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะแวดล้อมที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน เช่น ใน บรรจุภัณฑ์สุญญากาศ (vacuum packaging) และ ในบรรจุภัณฑ์ประเภท modified atmosphere packaging (MAP)			
การฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (themal processing)	ความร้อนสามารถทำลายเซลของ *L. monocytogenes*ได้ปริมาณที่ต้องลดเพื่อให้ปลอดภัยคือ 6 D process คือ ลดลง 6 log cycle (i.e. 106 or 6 decimal) จากปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ เช่น 70 องศาเซลเซียสใช้เวลา 2 นาที			

[a] The limits for growth and survival of L. monocytogenes presented in this table are based on research carried out primarily in laboratory media under optimum conditions and should only be used as estimates for the impact in foods.

[b] Optimum indicates when the growth of L. monocytogenes is fastest.

[c] Survival period will vary depending on nature of food and other factors.

[d] Inhibition of L. monocytogenes is dependent on type of acid present.

[e] Based on percent sodium chloride, water phase.

อาหารที่เกี่ยวข้อง

อาหารพร้อมบริโภค (ready-to-eat) ประเภทอาหารแช่เย็น (chilled food) สลัดผัก, โคลสลอว์, น้ำนมและผลิตภัณฑ์นม เนื้อสัตว์สัตว์ปีก

การป้องกัน

- การฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (thermal processing) ในระดับพาสเจอไรซ์ (pastureization) โดยใช้อุณหภูมิและเวลาให้เพียงพอที่จะลดปริมาณเซลล์ลงมาให้ได้อย่างน้อย 6 log cycle
- GMP, HACCP,
- หญิงตั้งครรภ์ และผู้ป่วยที่มีระดับภูมิต้านทานต่ำในทุกประเภท ควรหลีกเลี่ยงอาหารสุกๆดิบๆ
- สุขลักษณะส่วนบุคคล

<u>วิธีการตรวจหาเชื้อก่อโรคทางอาหาร</u>

ความปลอดภัยของอาหารและการปนเปื้อนจากเชื้อโรคสร้างผลกระทบต่อสุขอนามัยของทั่วโลก รวมถึงการดำเนินธุรกิจของคน การสร้างความเชื่อมั่นด้านอาหารปลอดภัยของสินค้าให้กับผู้บริโภคจึงเป็นสิ่งสำคัญ

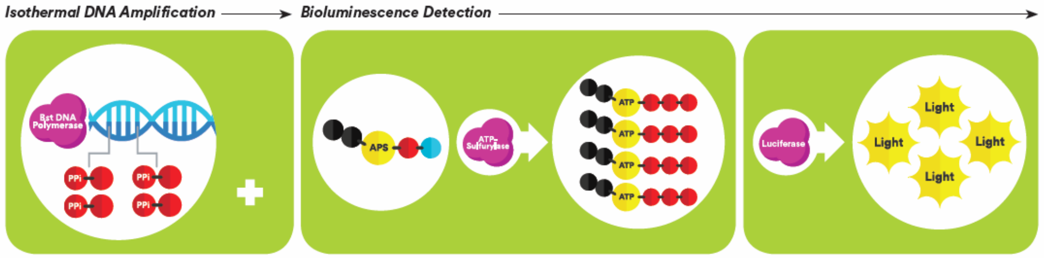
การตรวจวินิจฉัยหาเชื้อก่อโรคทางอาหารในผลิตภัณฑ์อาหาร จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องได้มาตรฐานตามกฎข้อบังคับของสำนักงานอาหารและยา (Food and Drug Administration) โดยทั่วไปการตรวจวินิจฉัยจะใช้วิธีทางการแยกเชื้อแบคทีเรียและวิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรียตามขั้นตอนในการเพาะเชื้อ (culture method) ทำให้ใช้เวลานานถึง 5-7 วัน จึงจะทราบผล ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) มาพัฒนาในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย ให้มีความรวดเร็ว สะดวกต่อการใช้ทดสอบ ถูกต้อง แม่นยำ และเพิ่มความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพให้ดีมากยิ่งขึ้นในอุตสาหกรรมอาหารและการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ จากการไปฝึกอบรมในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการตรวจและวิเคราะห์เชื้อก่อโรคทางอาหารในผลิตภัณฑ์อาหาร มีดังนี้

1. Molecular Detection System (MDS)

เป็นผลิตภัณฑ์จากบริษัท 3M ที่ผลิตออกมาเป็นชุดทดสอบและอุปกรณ์ที่ออกแบบให้สะดวกในการทำงานรวดเร็ว ประหยัดเวลา ถูกต้อง และแม่นยำ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ และสร้างความมั่นใจในความถูกต้องของผล เนื่องจากเป็นการทดสอบระดับโมเลกุล จึงมีความจำเพาะและความไวสูง จึงให้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำ ลดจำนวนการทดสอบซ้ำที่สิ้นเปลือง ขั้นตอนในการทดสอบง่าย ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและประสิทธิผลในการทดสอบของห้องปฏิบัติการ สามารถออกผล Positive แบบ Real time ช่วยให้ตัดสินใจได้ทันท่วงที สามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางอาหาร ได้แก่ *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, *Listeria* spp. และ *Listeria monocytogenes* ชุดทดสอบนี้ได้รับการรับรองจาก AOAC International Official Methods of Analysis Validation (OMA Method Number 2013.09)

MDS เป็นการพัฒนาเทคโนโลยีให้เหมาะสำหรับการตรวจหาเชื้อก่อโรค โดยการผสมผสานระหว่างเทคโนโลยีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้อุณหภูมิเดียว (Isothermal DNA Amplification) กับการตรวจเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีการตรวจวัดการเรืองแสง (Bioluminescence Detection) เพื่อออกผลได้รวดเร็วแม่นยำ และใช้งานง่าย ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพและประสิทธิผลในการตรวจวิเคราะห์ได้ดียิ่งขึ้น

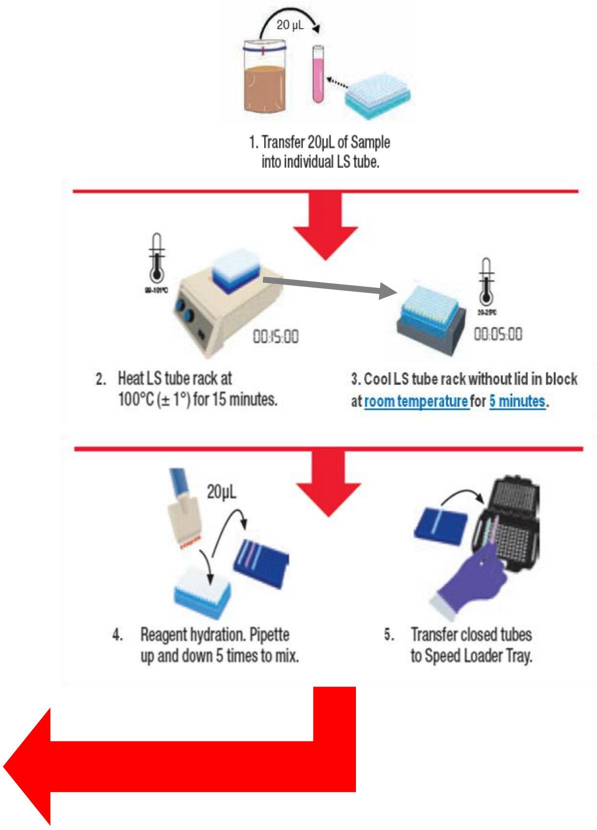
หลักการของ MDS จะใช้ primer ที่เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่มีความจำเพาะเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ซึ่งเป็น genome ของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องตรวจหา แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNA polymerase โดยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ ซึ่งเอนไซม์จะนำ Deoxyribonucletide triphosphate (dNTP) ที่เป็นเบสคู่สม (complementary base) กับ DNA template มาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ทำให้มีการปลดปล่อย pyrophosphate (PPi) ออกมา เอนไซม์ ATP sulfurylase จะเปลี่ยน PPi เป็น ATP (adenosine triphosphate) โดยจะรวมเข้ากับ APS (adenosine 5’ phosphosulfate) ซึ่ง ATP จะไปช่วย luciferase ในการเปลี่ยน luciferin เป็น oxyluciferin และปลดปล่อยแสงออกมาในปริมาณที่เป็นสัดส่วนกับปริมาณของ ATP สามารถตรวจจับแสงที่ปลดปล่อยออกมา โดยแสดงออกมาเป็น peak และให้ผลออกมาเป็น real time results ในระยะเวลาสั้น

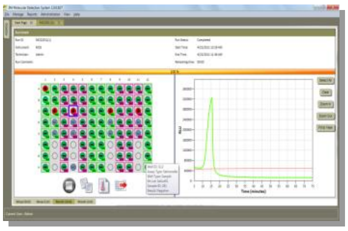


▲ Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is driven by robust *Bst* DNA polymerase, using six different primers for high specificity.

▲ Exponential generation of Pyrophosphate (PPi) is converted to Adenosine Tri Phosphate (ATP) by ATP-Sulfurylase.

▲ Luciferase uses ATP to generate light, providing real-time detection in as little as 15 minutes.





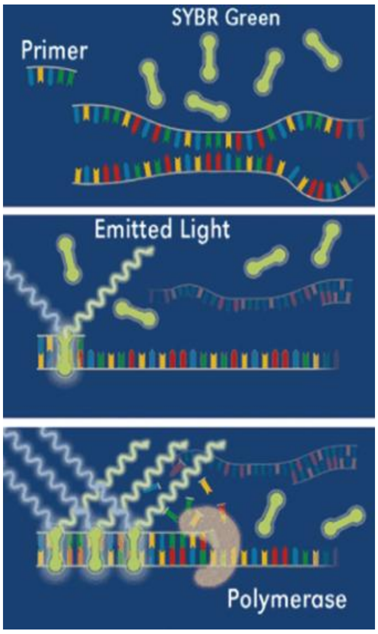
2. Real-Time Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณกรดนิวคลีอิคจากตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ที่มีความไวสูง และวิธีทำสะดวกไม่ยุ่งยาก ทำให้มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย ปัจจุบันมีการนำเทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ เช่น โรคติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย โรคพันธุกรรม และโรคมะเร็งต่างๆ รวมถึงการประยุกต์ใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ เนื่องจาก PCR แบบดั้งเดิม (conventional PCR) ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) ได้ แม้ว่าจะมีการพัฒนา quantitative PCR รูปแบบต่างๆ แต่ส่วนใหญ่วิธีการจะค่อนข้างยุ่งยาก ในทางปฏิบัติไม่เหมาะสำหรับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากๆ เพราะมีโอกาสเกิดความผิดพลาดในการทำและการอ่านผลมีความถูกต้องแม่นยำลดลง และ reproducibility ต่ำ ประกอบกับในปัจจุบัน ความต้องการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณในงานต่างๆ มีมากขึ้น เช่น การติดตามการรักษา การตรวจวินิจฉัยโรค เป็นต้น ทำให้มีการพัฒนาเทคนิค real-time PCR หรือ kinetic PCR ซึ่งเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจหา PCR products ในสารละลายโดยการใช้สารเรืองแสง (fluorescence reporters) ต่างๆ และพัฒนาเครื่อง thermal cycler เป็นเครื่อง real time thermal cycler โดยเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของ PCR products และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดจาก PCR products ในหลอดปฏิกิริยา ดังนั้นกรทำ real-time PCR จึงเป็นการทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอโดยที่สามารถตรวจวัดปริมาณ PCR products ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้นๆ ซึ่งต่างจาก conventional PCR ที่ตรวจหา PCR products หลังจากปฏิกิริยาเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอสิ้นสุดแล้ว

Real-time PCR หรือ Quantitative PCR (QPCR) เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากการทำ PCR แบบดั้งเดิม โดยใช้การติดฉลากด้วยสารเรืองสารประเภท fluorochrome ซึ่งใช้เป็นเป็น probe เข้าติดฉลากกับดีเอ็นเอในขั้นตอน primer เริ่มเข้าทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ หรือขั้นตอน annealing โดยสารเรืองแสงนี้จะเข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่เท่านั้น ทำให้สามารถวัดปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นจากสิ่งต้องการตรวจวัดได้ และสามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมาได้ทันที โดยไม่จำเป็นต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นก่อน วิธีการ real-time PCR เป็นวิธีการหาปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยา PCR ในแต่ละรอบทำให้ได้ค่าปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนจริงจากค่าของ exponential phase ที่ได้จากการเริ่มต้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย

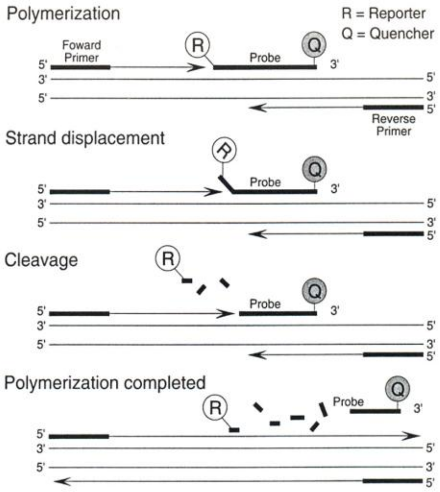
การตรวจสอบทางเคมีของ real-time PCR

1. ใช้สีที่สามารถแทรกสอดจับกับเส้นดีเอ็นเอ ตัวอย่างสีที่ใช้ ได้แก่ Sybr-Green I Dye (SG) ซึ่งเป็นสีฟลูออเรสเซนต์สามารถจับกับช่องเล็ก (minor groove) ของดีเอ็นเอสายคู่ได้ เมื่อสารนี้ถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลตจะมีการคายพลังงานออกมาเป็นแสงของฟลูออเรสเซนต์ ในช่วงการ denature เพื่อคลายสายดีเอ็นเอจากเส้นคู่ให้กลายเป็นเส้นเดี่ยวนั้น SG จะยังไม่สามารถเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวได้ แต่เมื่อเริ่มมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ SG จะเริ่มแทรกตัวเข้าไปในดีเอ็นเอเส้นคู่ และเรืองแสงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เมื่อรอบของ PCR กลับมาถึงช่วงการ denature อีกครั้ง SG ก็จะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอ ทำให้การเรืองแสงลดลงอีกครั้ง โมเลกุลของสีจะจับได้มากน้อยขึ้นกับความยาวของ PCR products ในกรณีที่มีดีเอ็นเอหลายชนิดปนกันอยู่ในตัวอย่าง สามารถแยกสัญญาณของฟลูออเรสเซนต์ได้จากการเปรียบเทียบค่า Tm ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเข้าคู่กันของสายดีเอ็นเอที่มีหมู่เบสเป็นคู่สมกัน เพราะ Tm เป็นคุณสมบัติเฉพาะของดีเอ็นเอเส้นคู่แต่ละเส้น ซึ่งแปรผันตรงกับเปอร์เซนต์ของเบส G และ C ที่อยู่ในสายดีเอ็นเอ (%GC content)



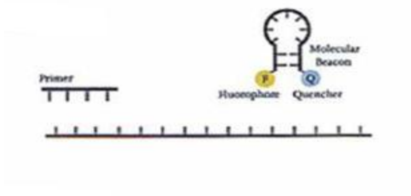
2. Hydrolysis probes : probe เป็นลักษณะ dual-labelled probe ใช้ probe ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ซึ่งเป็นสารเรืองแสง เป็นการตรวจสอบโดย Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) วิธีนี้จะใช้เมื่อต้องการความจำเพาะสูง ซึ่งการใช้ SG ไม่สามารถทำได้ วิธีนี้ทำโดยนำ fluorochrome หรือสีฟลูออเรสเซนต์ 2 ประเภท ติดฉลากเข้ากับสายของ probe เมื่อ probe ถูกกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูง fluorochrome ตัวแรก (Quencher) จะดูดซับพลังงานเอาไว้ และถ่ายทอดพลังงานให้ fluorochrome ตัวที่ 2 (Reporter dye) โดยไม่สูญเสียพลังงานออกมาสู่ระบบภายนอก เมื่อ Reporter ได้รับพลังงานจาก Quencher จะปล่อยพลังงานออกมาสู่ระบบภายนอกในรูปของแสง เมื่อมีการ amplify target sequence เกิดขึ้น เอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งมีคุณสมบัติของ 5’ exonuclease activity จะ hydrolyse probe ทำให้เกิดการแยกตัวของ Reporter และ Quencher fluorophore ดังนั้น fluorescence ของ reporter fluorophore จะถูกวัดได้ ในระหว่างแต่ละรอบของ PCR cycle แสง fluorescence จะเพิ่มขึ้นเพราะมีจำนวน reporter fluorophore ที่เป็นอิสระสะสมมากขึ้นเรื่อยๆ ปฏิกิริยาดังกล่าวนี้เรียกว่า FRET การใช้ probe ที่ติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์และนำมาใช้ในการไฮบริไดเซชัน มี 3 แบบ คือ

2.1 TaqMan hybridization probes เป็น probe เส้นเดียว ประกอบด้วย reporter และ quencher โดยที่ reporter dye จะเป็น fluorescein จับที่ปลาย 5´ ของ probe ห่างจากปลาย 5´ มาประมาณ 5 คู่เบส สี fluorescein นี้ได้แก่ FAM : 6-carboxy fluorescein; TET : tetrachloro-6-carboxyfluorescein; HEX : hexachloro-6-carboxy fluorescein ส่วน quencher dye ที่ใช้คือ TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine) จับที่ปลาย 3´ ของ probe เมื่อเกิดการไฮบริไดเซชัน สี fluorescein ของ reporter จะถูกกระตุ้น (excite) และปล่อยแสง (emit) ในการทำ real-time PCR เมื่อปฏิกิริยา extension เกิดขึ้น Taq DNA polymerase ที่มี 5´ nuclease activity จะตัด reporter dye ออกจาก probe ทำให้ reporter dye หลุดห่างออกจาก quencher dye และสามารถคายพลังงานออกมาในรูปของแสงฟลูออเรสเซนต์ได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยพลังงานสูง

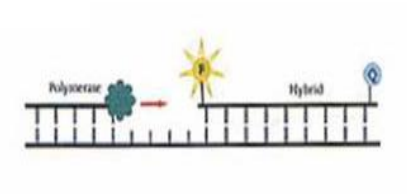


2.2 Molecular beacon probes เป็น probe ที่มีโครงสร้างเป็น hairpin loop เมื่อยังไม่ไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอเป้าหมาย มีลำดับเบสที่เป็นส่วนของ loop ที่ใช้ในการไฮบริไดเซชัน และส่วนที่สามารถจับเป็นเบสคู่สมได้ (self complementary) เป็น stem sequence ยึดติดกันด้วยพันธะไฮโดรเจนประมาณ 5-7 นิวคลีโอไทด์ และมีคู่เบส G-C มาก ทำให้ปลาย 5´ ที่ติดฉลากด้วย reporter fluor และปลาย 3´ ติดฉลากด้วย quencher dye เข้ามาอยู่ใกล้กัน จน quencher dye สามารถดูดซับพลังงานจาก reporter fluor ได้ บริเวณ hairpin จะถูกสร้างให้มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ถ้า probe ยังไม่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอเป้าหมายจะอยู่ในรูป hairpin loop ซึ่งไม่มีการฟลูออเรสเซนต์ หลังจาก probe เข้าจับดีเอ็นเอเป้าหมาย hairpin loop จะถูกสลายไป ทำให้ reporter fluor อยู่ห่างจาก quencher dye และปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมาได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยพลังงานสูง

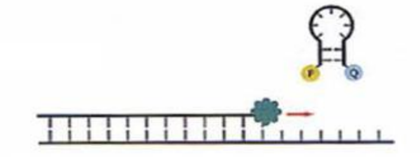
1. Denaturation



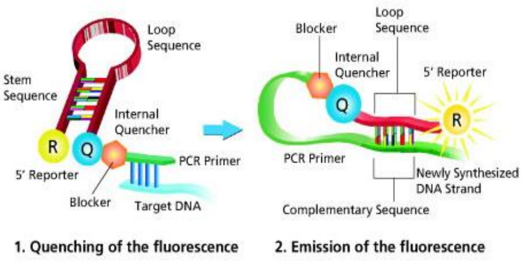
2. Hybridization



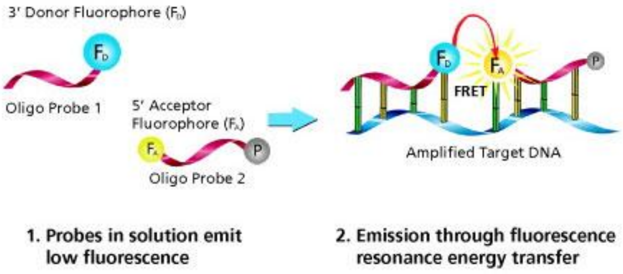
3. Extension



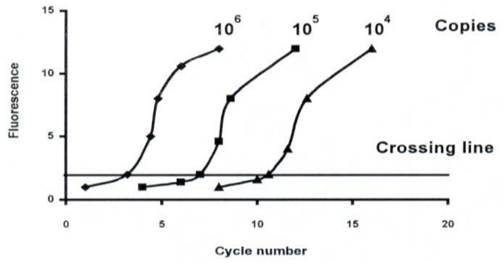
2.3 Scorpion probes เป็น hairpin loop ที่เชื่อมกับปลาย 5´ ของ primer หลังจากปฏิกิริยาในการ extension แล้ว probe สามารถที่จับกับเบสคู่สมภายในโมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมาย ทำให้โมเลกุล hairpin loop ของ probe ถูกเปิดออก ไม่มีการ quench ของฟลูออเรสเซนต์ และเกิดการเพิ่มสัญญาณตรวจวัดได้

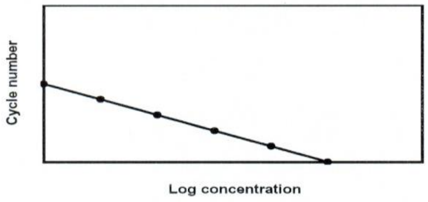


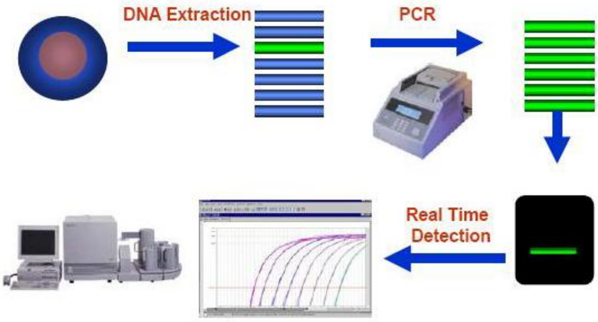
3. Hybridization probe หรือ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Probes เป็น probe ที่อาศัยการถ่ายเทพลังงานจากสีฟลูออเรสเซนต์ไปยังอีกสิ่งหนึ่ง โดยมีโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) ที่มีลำดับเบสจำเพาะ 2 สาย ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ เส้นแรกเป็น upstream probe ซึ่งเป็นโมเลกุลผู้ให้ (donor molecule) ทางบริเวณปลาย 3´ ส่วนอีกเส้นเป็น downstream probe ซึ่งเป็นโมเลกุลผู้รับ (acceptor molecule) ทางบริเวณปลาย 5´ probe ทั้ง 2 เส้น มีการออกแบบให้ไฮบริไดซ์ที่บริเวณใกล้กันบนโมเลกุลของดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งทำให้สีฟลูออเรสเซนต์ที่ติดอยู่บนโมเลกุลของ probe ทั้ง 2 เส้น เข้ามาใกล้กันและเกิดการถ่ายเทพลังงานจากโมเลกุลผู้ให้ไปยังโมเลกุลผู้รับ ปล่อยสัญญาณออกมาที่ความยาวคลื่นต่างกัน โดยแสงฟลูออเรสเซนต์ลดลงในโมเลกุลผู้ให้และเพิ่มขึ้นในโมเลกุลผู้รับ สามารถตรวจสอบแสงฟลูออเรสเซนต์ได้



การคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น สามารถทำได้โดยการใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานหรือดีเอ็นเอเป้าหมายที่ทราบปริมาณแน่นอน มาเพิ่มปริมาณควบคู่ไปกับดีเอ็นเอเป้าหมาย (unknown DNA) ข้อมูลที่ได้จากดีเอ็นเอมาตรฐานจะถูกนำมาสร้างเป็น calibration graph เพื่อนำมาเทียบกับดีเอ็นเอเป้าหมายและคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นได้ แกน Y ของ calibration graph แสดงปริมาณแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ตรวจวัดได้ แกน X เป็นจำนวนรอบ (cycle number) ของ PCR เส้นกราฟจะถูกสร้างขึ้นมาโดยอัตโนมัติจากข้อมูลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณเริ่มต้น เช่น 10^6, 10^5, 10^4 copies โดยจะตรวจวัดตรงรอบ (cycle) ของกระบวนการทำ PCR ซึ่งเครื่อง real-time thermal cycler สามารถตรวจจับสัญญาณการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (amplification signal) ที่เริ่มเข้าสู่ช่วง linear log phase ของแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอ (ตรงจุดตัดของ crossing line) หลังจากนั้นจะสร้าง calibration graph ขึ้นมาอีกระหว่างจำนวนรอบของกระบวนการทำ PCR (แกน Y, cycle number) ที่สัญญาณการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอเป้าหมายที่เริ่มเข้าสู่ช่วง linear log phase (ตรงจุดตัดของ crossing line) และความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน (แกน X, log concentration) ในส่วนของตัวอย่างที่ต้องการทราบปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นนั้น สามารถใช้จุดตัดของ amplification signal ที่แสดงผลเป็นจำนวนรอบของกระบวนการทำ PCR บน calibration graph มาคำนวณกลับหาปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นของตัวอย่าง ซึ่งขั้นตอนนี้กระบวนการทำ PCR แบบดั้งเดิมไม่สามารถทำได้







ปัจจุบันมีหลายบริษัทที่ผลิตเครื่อง real-time PCR ที่ใช้กันแพร่หลายในปัจจุบัน ได้แก่ ABI Prism, BioRad iCycler, Stratagene, Corbett, Eppendorf, Roche LightTyper & LightCycler เป็นต้น

ในการตรวจตัวอย่างอาหารจำนวนมาก จะใช้ Screening โดยวิธี MDS เพื่อใช้ในการออกผลตรวจวินิจฉัยได้รวดเร็ว แต่ถ้าได้ผลที่ไม่ชัดเจน จะต้องนำตัวอย่างไปทำการเพาะเชื้อ เพื่อเป็นการยืนยันซ้ำอีกครั้ง นอกจากนี้ถ้าต้องการทราบปริมาณเชื้อที่แม่นยำและรวดเร็ว ก็จะนำตัวอย่างอาหารไปตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR

จากการฝึกอบรมครั้งนี้ยังได้รับการฝึกอบรมในเรื่องต่าง ได้แก่ การเตรียมตัวอย่างอาหาร การเพาะเลี้ยงเชื้อ และการแยกเชื้อโดยการใช้วิธีต่างๆ เช่น coagulase test, CAMP test, การทดสอบ hemoysis, การทำ serotyping เป็นต้น

ส่วนที่ 4 ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะ

สถาบัน KIN Food Institute : เมือง Neumunster ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมันมีบุคลากรที่มีความรู้ความสามารถ มีประสบการณ์ในการทำงาน และได้รับการฝึกอบรมมาเป็นอย่างดี ซึ่งจะเห็นได้จากวิธีการถ่ายทอดความรู้ การเตรียมงานเพื่อให้ฝึกปฏิบัติด้านการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ความรู้ความเข้าใจในรายละเอียดของงานที่ทำ เช่น ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ด้านเชื้อจุลินทรีย์ ผู้ปฏิบัติงานทุกคนทราบรายละเอียดเนื้องานที่จะต้องทำ การแปรผลสาเหตุที่พบเชื้อจุลินทรีย์ การให้คำแนะนำเพื่อป้องกันและแก้ไขแก่โรงงานอุตสาหกรรม มีการเชื่อมโยงงานเข้ากับข้อกำหนดทางกฎหมายของประเทศ การใช้เครื่องมือวิเคราะห์ที่มีความทันสมัย และต้องใช้ผู้ที่มีความเชี่ยวชาญเป็นอย่างมากในการปฏิบัติงาน จึงทำให้การฝึกอบรมในครั้งนี้ได้รับ

ผลประโยชน์เป็นอย่างดียิ่งทั้งในด้านทฤษฎี ด้านการฝึกปฏิบัติ และการติดต่อประสานงานระหว่างหน่วยงานที่ฝึกอบรมกับหน่วยงานอื่นๆ ได้รับทราบถึงข้อกำหนดและกฎหมายที่เกี่ยวข้อง การค้นคว้าข้อมูลต่างๆ การรับตัวอย่างจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร การดำเนินการจัดเก็บและส่งตัวอย่างให้กับห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้อง การเตรียมตัวอย่าง การจัดการระบบปลอดเชื้อในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังได้มีโอกาสได้เยี่ยมชม และฝึกปฏิบัติในห้องปฏิบัติการและหน่วยงานที่นอกเหนือจากโปรแกรมกำหนด เช่น การทำ challenge test เพื่อศึกษาความเพียงพอในการฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์เห็ดในน้ำเกลือบรรจุขวดแก้วที่อาคารแปรรูปอาหาร วิธีการเตรียมตัวอย่าง การเติมเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร การฆ่าเชื้อ การใช้โปรแกรมคำนวณค่าความเพียงพอในการฆ่าเชื้อ (Sterilizing value, F_o) การวิเคราะห์เชื้อที่เหลือรอดจากกระบวนการศึกษา (ได้แก่เชื้อ Putrefractive anaerobe bacteria) และการนำมากำหนดกระบวนการฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์

(ลงนาม) ....
(รองศาสตราจารย์ ดร. นวลฉวี เวชประสิทธิ์)
ผู้รายงาน

วันที่ ....

ส่วนที่ 5 ความเห็นของผู้บังคับบัญชาของเจ้าสังกัด และโครงการที่ดำเนินงานต่อไป (ยกเว้นกรณีผู้รายงานเป็นข้าราชการตั้งแต่ระดับอธิบดีหรือเทียบเท่าขึ้นไป

5.1 <u>ความเห็นของหัวหน้าภาควิชา</u>

....
....
....

(ลงนาม) ....
(อาจารย์ ดร. ธนาสาร ขาวสอาด)
ผู้ประสานงานสาขาวิชาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

วันที่ ....

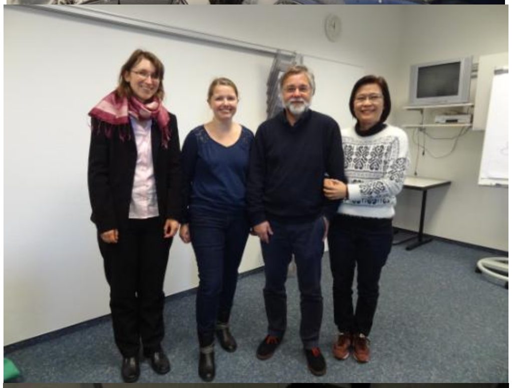
5.2 <u>ความเห็นของคณบดี</u>

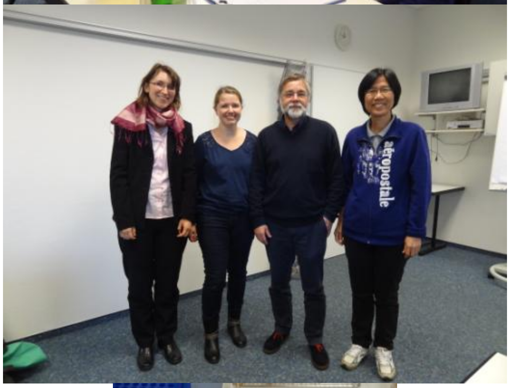
....
....
....

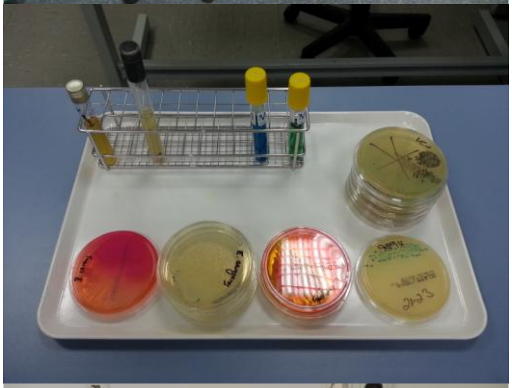
(ลงนาม) ....
(รองศาสตราจารย์ ปรีชา พหลเทพ)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

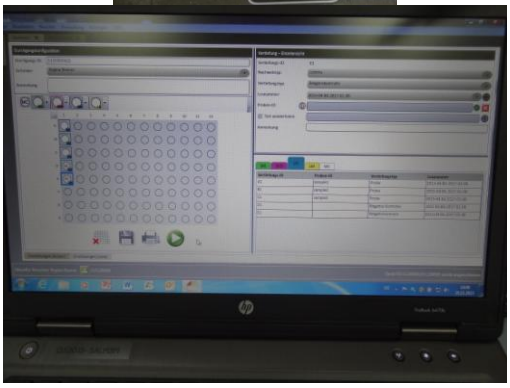
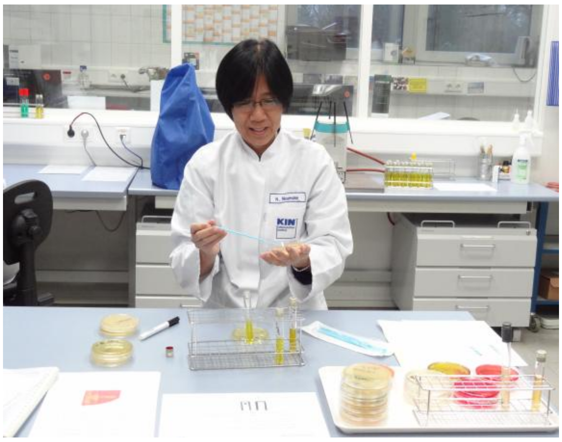
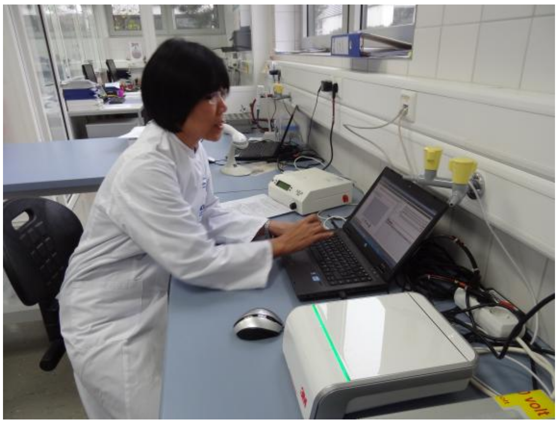
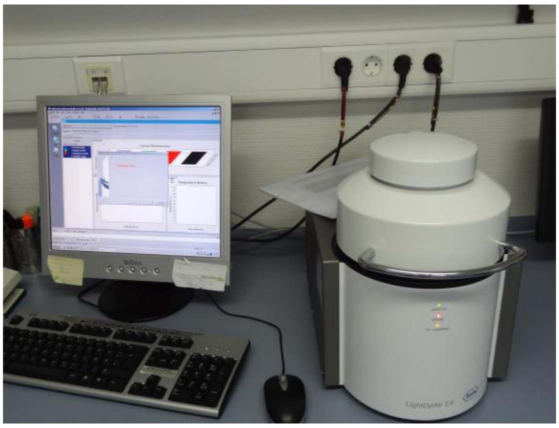
วันที่ ....

ภาพประกอบการฝึกอบรม (1)









ภาพประกอบการฝึกอบรม (2)